

ACCIÓN ANTI-VIRAL DE UNA PROTEÍNA AISLADA DE LA HEMOLINFA DE *LONOMIA OBLIQUA*

Ronaldo Z. Mendonça^{1*}, Katia N. Greco¹, Roberto H.P. Moraes¹, Rita M.Z. Mendonça², Carlos A. Pereira, Dalva A.P. Mancini² ¹Laboratório de Parasitologia, ² Laboratório de Virologia; Instituto Butantan, São Paulo, Brasil,

* Correspondence to R. Z. Mendonça Institute Butantan, Laboratory de Immunology Viral, Av. Vital Brazil 1500 CEP. 05503-900 São Paulo-Brasil, fax: (55)(11)3726.1505; e-mail: zucatelli@uol.com.br.
Palabras clave: *Lonomia obliqua*, hemolinfa, acción antiviral, Influenza, Sarampión, picornavirus

Introducción: El control de los virus, especialmente los responsables de la gripe, es de gran interés en el área de la salud pública. Sin embargo, son pocos los artículos antivirales disponibles para el control de estas enfermedades. Para eso, la identificación de los agentes antivirales es de gran importancia. Varios estudios se han realizado que demuestran la presencia de sustancias farmacológicamente activas en la hemolinfa. A pesar de esto, pocas de estas actividades han sido estudiadas en los insectos. Se cree que los insectos han surgido en el período Devónico, más de 350 millones de años. Durante este período los insectos sobrevivieron y han vivido en casi todos los nichos ecológicos del planeta; desde las zonas desérticas, regiones polares, medio ambiente contaminado o extremadamente agresivo para el desarrollo de la vida. A pesar de no haber desarrollado un sistema inmune para la supervivencia, los insectos han desarrollado una protección basada en péptidos inespecíficos con acción antibacteriana, antiviral y anti-fúngica. Así, el objetivo de este estudio fue identificar, aislar y caracterizar las proteínas obtenidas de la hemolinfa de *Lonomia obliqua* con acción antiviral

Metodología. Células VERO, en fase de crecimiento exponencial, fuerán infectadas con picornavirus (Sabin 1) o virus del sarampión con multiplicidad de la infección (moi) de 0,01 a 0,1. Células MDCK fueron utilizadas para la replicación del virus de la influenza (H1N1; A/SP/1/78). La hemolinfa (1% v / v), se añadió al cultivo 1 hora antes de la infección.

Hemolinfa: Hemolinfa fue obtenida de larvas de *Lonomia obliqua* (Lepidoptera, Saturniidae). La hemolinfa fue colectada a partir de la extravasación resultantes de la remoción de scole (cierdas). La hemolinfa se centrifugo a 1.000 g durante 10 minutos, se inativó a 60° C durante 30 minutos y se filtró en membrana de 0.22 µm. El material se mantuvo a 4° C y se utilizó como complemento de los cultivos en las concentraciones de 1%.

Fraccionamiento de la hemolinfa por cromatografía. Se utiliza para el fraccionamiento de la hemolinfa, columnas de cromatografía "Superdex 75" y cromatografía de intercambio iónico en un cromatógrafo de alta presión AKTA purificador

Titulación viral. El virus fue determinado por TCID₅₀, hemaglutinación (HA) y inmunofluorescencia

Resultados y discusión. Los resultados se presentan abajo. Como puede verse en las figuras 1 y 2, la adición de 1 % del hemolinfa total o su fracción purificada fue capaz de reducir en más de

90 % la replicación del virus del sarampión y de la gripe en cultivos de células infectadas por estos virus.

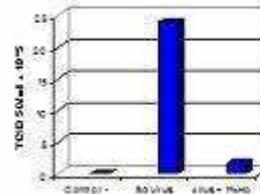


Figura 1: Titulo de virus del Sarampión en el sobrenadante de cultivos infectados y tratados o no con 1 % de hemolinfa total (Hb).

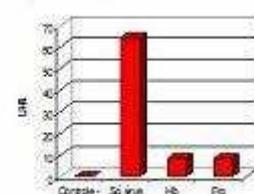


Figura 2: Titulo hemaglutinante del virus de la Influenza en el sobrenadante de cultivos infectados y tratados o no con hemolinfa total (Hb) o purificada

Como puede verse en el Cuadro 1, la hemolinfa pudo reducir en un 59 % el número de células infectadas con una alta fluorescencia, después del marcaje de éstas con anticuerpos específicos

	% de células con alta intensidad de Fluorescencia
Control (No infectado)	0,04
Células Infectadas	81,95
Células Infectadas y tratadas con Hb	34,63

Cuadro 1: Producción de los virus del sarampión en células VERO. Cultivos de células VERO fueron infectadas con 0,1 MOI del virus del sarampión. En uno de los cultivos se añadió 1 % (v / v) de hemolinfa cruda (Hb). Después de 72 h se obtuvo una muestra, fue teñida con anticuerpos antisarampión. El número de células con una alta infección viral fue determinado por fluorescencia.

Figura 3. Fotos de cultivos de células VERO infectadas o no con el virus de la poliomiélitis, después del tratamiento o no con la hemolinfa. Como puede verse, la hemolinfa fue capaz de eliminar el efecto citopático (ECP) de las células infectadas.



Figura 3. Foto de cultivos de células VERO infectadas con el virus de la poliomiélitis (Sabin 1) (48 h pi), tratadas o no con 1 % (v/v) de hemolinfa.

Conclusiones. La adición de la hemolinfa en cultivos de células infectadas con el virus de la influenza, sarampión y poliomiélitis fue capaz de evitar la muerte celular y la propagación del virus. Las células infectadas y tratadas con hemolinfa ha mantenido una alta viabilidad, lo que sugiere que en la hemolinfa de *Lonomia obliqua* hay una proteína con alto potencial antiviral, lo que pueden ser de gran interés en el control de virus humanos o de animales.

Agradecimiento: FAPESP/03/08728-1; 06/02108-